

## ABSTRACT

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a compound that has PAR2 inhibitory action and is useful as a therapeutic agent, a preventive agent or a disease progress inhibitor against the PAR2-participating diseases.

**SOLUTION:** The PAR2 inhibitor contains, as an active ingredient, the compound represented by formula (1) (wherein R<1> and R<2> are independently H, hydroxy, an alkoxy, nitrile, an aryl or an alkyl, or R<1> and R<2> are bound together with adjacent carbon atoms to form a heterocyclic cycloalkane having 1 or 2 N atoms, 0-1 O atom and 0-1 S atom; R<3> is H, an alkyl, a haloalkyl or an aryl; R<4> and R<5> are independently H, a halogen, an alkyl, an alkoxy, methylenedioxy or a haloalkyl), or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

## CLAIMS

No Claims were found.

## DESCRIPTION

Text Not Available.

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-286171

(P2003-286171A)

(43) 公開日 平成15年10月7日 (2003. 10. 7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
A 6 1 K 31/519		A 6 1 K 31/519	4 C 0 5 0
A 6 1 P 1/04		A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 6
3/10		3/10	
9/00		9/00	
9/10	1 0 1	9/10	1 0 1
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-90380 (P2002-90380)

(22) 出願日 平成14年3月28日 (2002. 3. 28)

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 井上 忠弘

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友製  
薬株式会社内

(72) 発明者 瓦井 裕子

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友製  
薬株式会社内

(74) 代理人 100121588

弁理士 五十部 穰

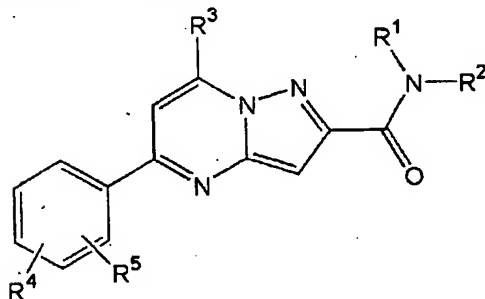
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PAR阻害剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 PAR2が関与する疾患の治療剤、予防剤、または進行防止剤として有用なPAR2阻害活性を有する化合物を提供する。

【解決手段】 一般式 (1) :



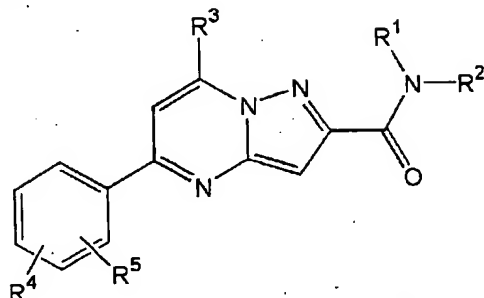
(式中、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、独立して、水素原子を表すか、水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、アリール基、またはアルキル基を表すか、あるいは、R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> は隣接する炭素原子とともに結合して、1~2個の窒素原子、0~1個の酸素原子、および0~1個の硫黄原子を含むヘテロシクロアルカンを形成しており、R<sup>3</sup> は、水

素原子、アルキル基、ハロアルキル基、またはアリール基を表し、R<sup>4</sup> および R<sup>5</sup> は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、メチレンジオキシ基、またはハロアルキル基を表す。) で表される化合物、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有するPAR2阻害剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)

【化1】



(式中、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、独立して、水素原子を表すか、水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のヘテロアリール基で置換されていてもよいアルキル基を表すか、あるいは、R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> は隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、アルキルカルボニル基、アルコキシカルボニル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のアリールアルキル基で置換されていてもよい1~2個の窒素原子、0~1個の酸素原子、および0~1個の硫黄原子を含むヘテロシクロアルカンを形成しており、R<sup>3</sup> は、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、または置換もしくは無置換のアリール基を表し、R<sup>4</sup> および R<sup>5</sup> は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、メチレンジオキシ基、またはハロアルキル基を表す。) で表される化合物、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有するPAR2阻害剤。

【請求項2】 R<sup>3</sup> がハロアルキル基で表されることを特徴とする、請求項1記載のPAR2阻害剤。

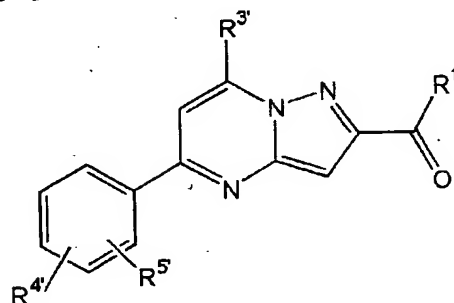
【請求項3】 R<sup>3</sup> で表されるハロアルキル基が、トリフルオロメチル基であることを特徴とする、請求項2記載のPAR2阻害剤。

【請求項4】 R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> が隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルコキシカルボニル基、フェニル基、またはベンジル基で置換されていてもよい、ピペリジン、パーヒドロアゼピン、モルホリン、チオモルホリン、またはピペラジンを形成していることを特徴とする、請求項1~3のいずれか記載のPAR2阻害剤。

【請求項5】 R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> が隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、または、アルコキシカルボニル基で置換されていてもよい、ピペリジン、またはパーヒドロアゼピンを形成していることを特徴とする、請求項4記載のPAR2阻害剤。

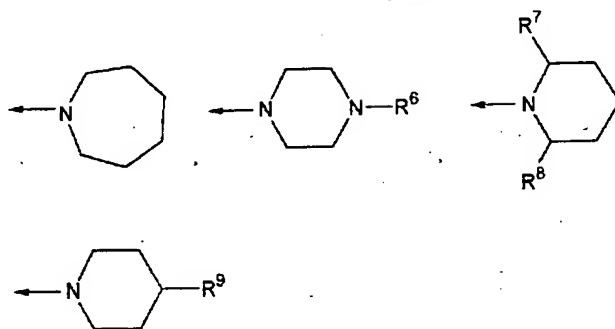
【請求項6】 一般式(2)

【化2】



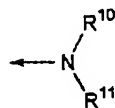
[式中、R<sup>1'</sup> は、以下の群：

【化3】



または、

【化4】



(式中、R<sup>6</sup> は水素原子、アリールカルボニル基、またはアルキルカルボニル基を表し、R<sup>7</sup> は、水素原子、またはアルキル基をあらわし、R<sup>8</sup> および R<sup>9</sup> は、水素原

子、アルキル基、またはアルコキシカルボニル基を表し、R<sup>10</sup> はアルキル基を表し、R<sup>11</sup> は水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のヘテロアリール基で置換されていてもよいアルキル基を表す。) から選択される基を表し、R<sup>3'</sup> は、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、またはフェニル基を表し、R<sup>4'</sup> および R<sup>5'</sup> は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、またはハロアルキル基を表す。] で表される化合物、ま

たはその薬学上許容される塩を有効成分として含有するPAR2阻害剤。

【請求項7】 PAR2阻害活性を有する化合物を有効成分として含有する、PGE2産生抑制剤。

【請求項8】 PAR2阻害活性を有する化合物が、請求項1～6のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩であることを特徴とする請求項7記載のPGE2産生抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、PAR2阻害剤、および該PAR2阻害剤を有効成分として含有する、PAR2が関与する、アレルギー疾患、呼吸器疾患、心血管系疾患、神経系疾患、炎症性疾患、神経性炎症性疾患、もしくは関節症疾患の、治療剤、予防剤、または進行防止剤に関する。

【0002】

【従来の技術】プロテアーゼ受容体PAR (proteinase-activated receptor) はGタンパク共役7回膜貫通型受容体の一種であり、トロンビン、トリプシンなどのセリンプロテアーゼの細胞作用を媒介する受容体ファミリーで、現在までに4つのPAR; PAR1, PAR2, PAR3, PAR4 がクローニングされている。前記セリンプロテアーゼはPAR分子の細胞外N末端側のペプチド鎖を特定部位で切断することにより、5-6アミノ酸残基からなる受容体活性化配列を有する新しいN末端を露出させる。新たに露出したN末端が、鎖状リガンドとしてPAR自身の活性部位に結合することにより、受容体の活性化が起こる。PAR2はトリプシン、トリプターゼ、または、血液凝固第VIIaもしくはXa因子によって活性化されることが明らかとなっている。また、受容体活性化配列に基づいて合成した5～6個のアミノ酸から成る合成ペプチドにより、活性化されることが知られている (Dery, O. et al. *Am. J. Physiol.*, 274, C1429-52, 1998; Macfarlane, S.R. et al., *Pharmacol. Rev.* 53, 245-82, 2001)。PAR2は、血管、前立腺、小腸、結腸、肝臓、腎臓、脾臓、胃、肺、脳および皮膚に発現していることが報告されている。また、PAR2を介する細胞内シグナルとしては、ホスホリパーゼCの活性化に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇とイノシトール3リン酸の産生 (Santulli, R.J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9151-5, 1995; Bohm, S.K. et al. *Biochem. J.*, 314, 1009-16, 1996)、p38 MAPキナーゼの活性化、およびc-Jun N-terminalキナーゼの活性化などが知られている (Kanke, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 276, 31657-66, 2001)。PAR2は、消化液の分泌 (Kawabata, A. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 298-302, 2000; Kawabata, A. et al., *J. Clin. Inv.*, 107, 1443-50, 2001) に関与していることが知られている一方で、神経性炎症 (Steinhoff, M., et al., *Nature Medicine*, 6, 151-8, 2000)、

疼痛 (Kawabata, A. et al., *Neuroreport* 12, 715-9, 2001; Hoogerwerf, W.A. et al., *J. Neurosci.*, 21, 9036-42, 2001; Vergnolle, N., et al., *Nature Medicine*, 7, 821-6, 2001)、炎症 (Nystedt, S., et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 14910-5, 1996; Lindner, J. R. et al., *J. Immunol.*, 165, 6504-10, 2000)、アレルギー (Sun, G. et al., *J. Immunol.*, 167, 1014-21, 2001; Miike, S. et al., *J. Immunol.*, 167, 6615-22, 2001) などの種々の疾患において増悪因子であることが知られている。また、受容体活性化配列に基づく合成ペプチド誘導体がPAR2アゴニストとして報告されているが、該合成ペプチド誘導体を用いた検討等から、PAR2アンタゴニストが腸疾患治療薬、皮膚色素沈着防止薬、アレルギー性疾患、または癌転移抑制剤として有用であることが示唆されている。また、PAR2アゴニストは、気管支疾患治療薬、または消化器保護作用薬として有用であることが示唆されている。しかしながら、実際にPAR2阻害活性を有する化合物は、全く知られていなかった。一方、ピラゾピリミジン骨格を有する化合物は、ケミカルアブストラクトにおいて、レジストリー番号: 334500-35-5、304686-65-5、312634-72-3、312918-87-9、312934-98-6、313987-33-6、または313986-65-1等の化合物が公知である。また、抗炎症・鎮痛作用を有するピラゾピリミジン化合物として、特開平5-125079、特開平11-279178、国際特許公開第95/35298号に記載された化合物が知られているが、PAR2阻害活性との関係を示唆する化合物は全く知られていない。また、PGE2産生抑制作用を有するピラゾピリミジン化合物も知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】現在、PAR2が様々な疾患に関与することが考えられているが、PAR2を阻害する化合物は得られていない。本発明が解決しようとする課題は、PAR2に対する阻害剤を見出し、PAR2が関与する疾患の治療剤を提供することにある。

【0004】

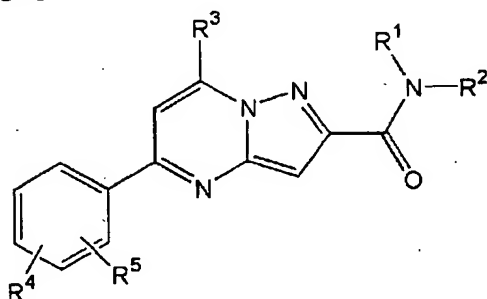
【課題を解決するための手段】本発明者らは、PAR2阻害剤が、PAR2の機能亢進が原因となっている種々の疾患の治療剤として有用であると考え、HEK293細胞を用いてFluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR)で測定する方法等を用いて、細胞内カルシウム濃度の変化を測定することにより、種々の被験化合物のPAR2阻害活性を測定した。その結果、ピラゾピリミジン化合物がPAR2阻害活性を示すことを見出した。また、関節を構成する軟骨や滑膜の培養細胞において、PAR2が発現していること、および、該培養細胞に合成ペプチドアゴニストやトリプシンを添加してPAR2を活性化させると、関節炎増悪物質であるプロスタグランジンE2 (PGE2) の放出が起こる事を見出した。PGE2は、慢性関節リウマチ等の関節炎の患部組織において増加していることがわかっており、関節炎の

増悪因子であると考えられている。従って、上記の知見より、PAR2は関節炎の増悪因子であると考えた。更に、培養細胞におけるPGE2の放出は、前記ピラゾピリミジン化合物により阻害されることがわかった。すなわち、PAR2阻害剤は、PGE2産生阻害活性を示し、PGE2の機能亢進を伴う疾患の治療剤として有用である。本発明は以上の知見に基づき、完成するに至ったものである。

【0005】すなわち、本発明は、

〔1〕 一般式(1)

【化5】



(式中、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、独立して、水素原子を表すか、水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のヘテロアリール基で置換されていてもよいアルキル基を表すか、あるいは、R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> は隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、アルキルカルボニル基、アルコキシカルボニル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のアリールアルキル基で置換されていてもよい1～2個の窒素原子、0～1個の酸素原子、および0～1個の硫黄原子を含むヘテロシクロアルカンを形成しており、R<sup>3</sup> は、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、または置換もしくは無置換のアリール基を表し、R<sup>4</sup> および R<sup>5</sup> は、独立して、水素原子、ハロゲン

原子、アルキル基、アルコキシ基、メチレンジオキシ基、またはハロアルキル基を表す。で表される化合物、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有するPAR2阻害剤。

〔2〕 R<sup>3</sup> がハロアルキル基で表されることを特徴とする、〔1〕記載のPAR2阻害剤。

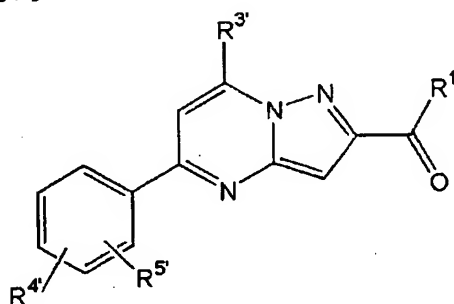
〔3〕 ハロアルキル基がトリフルオロメチル基であることを特徴とする、〔2〕記載のPAR2阻害剤。

〔4〕 R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> が隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルコキシカルボニル基、フェニル基、またはベンジル基で置換されていてもよい、ピペリジン、パーヒドロアゼピン、モルホリン、チオモルホリン、またはピペラジンを形成していることを特徴とする、〔1〕～〔3〕のいずれか記載のPAR2阻害剤。

〔5〕 R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> が隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、または、アルコキシカルボニル基で置換されていてもよい、ピペリジン、またはパーヒドロアゼピンを形成していることを特徴とする、〔4〕記載のPAR2阻害剤。

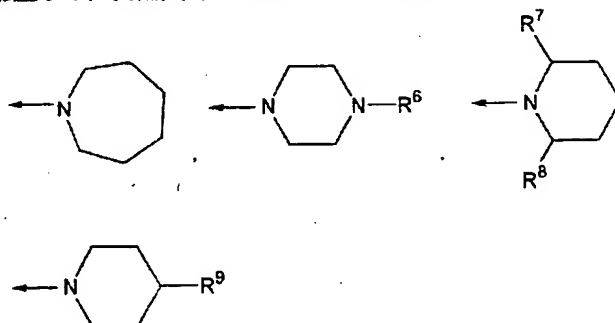
〔6〕 一般式(2)

【化6】

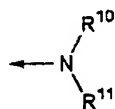


〔式中、R<sup>1</sup> は、以下の群：

【化7】



または、  
【化8】



(式中、R<sup>6</sup> は水素原子、アリールカルボニル基、またはアルキルカルボニル基を表し、R<sup>7</sup> は、水素原子、またはアルキル基をあらわし、R<sup>8</sup> および R<sup>9</sup> は、水素原子、アルキル基、またはアルコキシカルボニル基を表し、R<sup>10</sup> はアルキル基を表し、R<sup>11</sup> は水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、置換もしくは無置換のアリール

基、または置換もしくは無置換のヘテロアリール基で置換されていてもよいアルキル基を表す。)から選択される基を表し、R<sup>3</sup>は、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、またはフェニル基を表し、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、またはハロアルキル基を表す。]で表される化合物、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有するPAR2阻害剤。

[7] PAR2阻害活性を有する化合物を有効成分として含有する、PGE2産生抑制剤。

[8] PAR2阻害活性を有する化合物が、[1]～

[6]のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩であることを特徴とする請求項7記載のPGE2産生抑制剤。

[9] PAR2阻害活性を有する化合物を有効成分として含有する、抗炎症剤。

[10] PAR2阻害活性を有する化合物が、[1]～

[6]のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩であることを特徴とする[9]記載の抗炎症剤。

[11] [1]～[6]のいずれか記載の化合物、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする鎮痛剤。

【0006】

【本発明の実施の形態】本明細書において、PAR2とは、Gタンパク共役7回膜貫通型受容体に属するトリプシンやトリプターゼ等のプロテアーゼによって活性化される受容体(proteinase-activated receptor)であるポリペプチドを表し、既知のPAR2アゴニストとの結合活性を保持しているか、あるいは、PAR2活性を保持している限り、そのホモログや誘導体も含んでいる。そのアミノ酸配列は、ヒトについては、Bohm, S.K. et al. Biochem. J., 314, 1009-16, 1996 (Genbank Ac. No. U34038)に開示されている。他の動物種のホモログについては、マウス: Nystedt S. et al., J. Biol. Chem., 270, 5950-55, 1995 (Genbank Ac. No. Z48043); ラット: Saifedine M. et al., Br. J. Pharmacol., 118, 521-30, 1996 (Genbank Ac. No. U61373)にそれぞれ開示されている。ここで既知のPAR2アゴニストとしては、具体的には、受容体活性化配列に基づいて合成されたポリペプチド: SLIGKV, SLIGRLやその改変ペプチドtrans-cinnamoyl-LIGRL等が挙げられる。

【0007】本明細書においてPAR2阻害剤とは、PAR2の活性を阻害する方向へ作用する化合物であれば何ら限定されるものではなく、PAR2の発現量を減少させる化合物、PAR2アンタゴニスト等を含む概念である。ここで「PAR2の発現量を減少させる化合物」とは、PAR2をコードするmRNAの発現量を減少させる化合物、またはPAR2の蛋白質量を減少させる化合物を表す。本明細書において、PAR2の活性の測定方法としては、細胞内カルシウム

の濃度上昇、細胞内イノシトール3リン酸の産生増加、プロテインキナーゼCやMAPキナーゼによる細胞内タンパク質のリン酸化増加、または、細胞からのプロスタグランジンE2 (PGE2) 放出増加量の測定が挙げられる。細胞内カルシウム濃度上昇活性の測定方法としては、ヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293細胞、ヒト肺ガン由来細胞株A549、またはヒト胎児肺由来細胞株HFL1等の培養細胞株にカルシウム結合性蛍光プローブをあらかじめ取り込ませ、PAR2アゴニスト (NH<sub>2</sub>-SLIGRL-CONH<sub>2</sub>等の合成ペプチド)、もしくはトリプシン等を添加してPAR2を活性化することによって変動する細胞内カルシウム濃度を、蛍光シグナルの変化としてFLIPR (Molecular Devices社)で経時的に検出する方法が挙げられる。また、Aequorin等のCa結合性発色蛋白質高発現細胞株を用いて、カルシウム濃度に比例して生ずる蛍光強度を定量することによって、細胞内カルシウム濃度を測定することも可能である。具体的には本明細書実施例に記載された方法が挙げられる。本明細書のPAR2阻害剤は、好ましくは、実施例16に記載された方法において、10 μg/mlにおいて30%以上のPAR2阻害活性を示す化合物である。また、本明細書のPAR2阻害剤は、好ましくは分子量300～2000、好ましくは分子量300～800の低分子有機化合物である。

【0008】PGE2産生抑制剤とは、PGE2の産生量を抑制する化合物を表し、該化合物のPGE2産生抑制活性は、公知の方法を用いることによって測定することができる。具体的には、PGE2産生抑制活性は、SW982細胞株において、被験化合物、およびPAR2アゴニストもしくはトリプシン等のPAR2を活性化する物質を添加し、1時間～24時間培養した後、培養上清中のPGE2産生量を測定することにより、算出できる。PGE2を検出する方法としては、プロスタグランジンE2抗体等を用いる方法が挙げられる。

【0009】本明細書において、アルキル基とは炭素数1～10のアルキル基を表し、好ましくは炭素数1～6のアルキル基を、更に好ましくは炭素数1～4のアルキル基を表す。具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、1-メチルエチル基、またはブチル基等が挙げられる。本明細書において、アルコキシ基とは炭素数1～10のアルコキシ基を表し、好ましくは炭素数1～6のアルコキシ基を、更に好ましくは炭素数1～4のアルコキシ基を表す。具体的にはメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、1-メチルエトキシ基、またはブトキシ基等が挙げられる。本明細書において、ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子を表し、好ましくは、フッ素原子または塩素原子を表す。本明細書において、ハロアルキル基とは、同一または異なる、1～3個のハロゲン原子を含む炭素数1～2のハロアルキル基を表し、具体的には、トリフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、1, 1, 1-トリフルオロエチル基、または2, 2-ジフルオロエチル基等が挙げら

れる。好ましくは、トリフルオロメチル基が挙げられる。本明細書において、ヘテロシクロアルカンとしては、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、チオモルホリンオキシド、チオモルホリンジオキシド、パーヒドロアゼピン、または、パーヒドロジアゼピン等が挙げられる。好ましくは、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、または、パーヒドロアゼピンが挙げられる。前記ヘテロシクロアルカンが置換されている場合の置換基としては、アルキル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、アルキルカルボニル基、アルコキシカルボニル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のアリールアルキル基が挙げられる。好ましくは、炭素原子上で置換されている場合の置換基としては、炭素数1~4のアルキル基、または炭素数2~4のアルコキシカルボニル基が挙げられる。また、前記ヘテロシクロアルカンが窒素原子上で置換されている場合の置換基としては、炭素数1~4のアルキル基、炭素数2~4のアルコキシカルボニル基、炭素数1~4のアルキルカルボニル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、置換もしくは無置換のアリールアルキル基が挙げられる。前記置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のアリールアルキル基としては、フェニル、1-ナフチル、または2-ナフチルが挙げられ、特に好ましくはフェニルが挙げられる。また、前記置換アリールカルボニル基、置換アリール基、または置換アリールアルキル基における置換基としては、ハロゲン原子、炭素数1~4のアルキル基、炭素数1~4のアルコキシ基、またはメチレンジオキシ基等が挙げられる。

【0010】一般式(1)で表される化合物において、 $R^1$ および $R^2$ は好ましくは、隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、アリールカルボニル基、アルキルカルボニル基、またはアルコキシカルボニル基で置換されていてもよい1~2個の窒素原子、0~1個の酸素原子、および0~1個の硫黄原子を含むヘテロシクロアルカンを形成しており、該ヘテロシクロアルカンは、好ましくは、ピペリジン、ピペラジン、またはパーヒドロアゼピンである。あるいは、一般式(1)で表される化合物において、 $R^1$ が炭素数1~4のアルキル基を表し、 $R^2$ が、水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のヘテロアリール基で置換されていてもよいアルキル

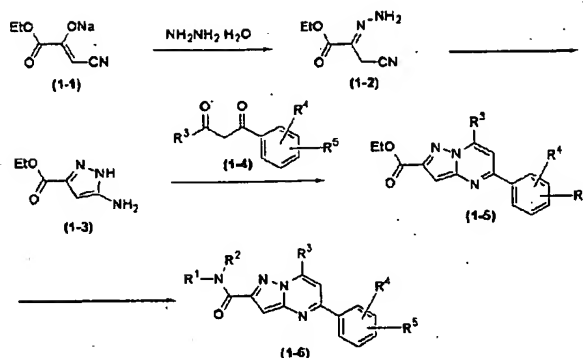
基を表すのもまた、好ましい態様の一つである。前記アリール基としてはフェニル基が挙げられる。また、前記ヘテロアリール基としては、ピリジル基が挙げられる。 $R^2$ におけるアルキル基の置換基が置換アリール基もしくは置換ヘテロアリール基を表す場合の、アリール基もしくはヘテロアリール基の置換基としては、ハロゲン原子、炭素数1~4のアルキル基、炭素数1~4のハロアルキル基、または炭素数1~4のアルコキシ基が挙げられる。一般式(1)で表される化合物において、 $R^3$ におけるアリール基としては、フェニル基が挙げられ、該アリール基が置換されている場合の置換基としては、ハロゲン原子、炭素数1~4のアルキル基、炭素数1~2のハロアルキル基、または炭素数1~4のアルコキシ基が挙げられる。 $R^3$ は好ましくは炭素数1~3のアルキル基、フェニル基、または炭素数1~2のハロアルキル基を表す。特に好ましい例として、トリフルオロメチル基が挙げられる。一般式(1)で表される化合物において、 $R^4$ および $R^5$ は、好ましくは、同一または異なって、水素原子、または、ハロゲン原子を表す。

【0011】一般式(2)において、 $R^6$ は、好ましくは、水素原子、炭素数2~4のアルキルカルボニル基、またはベンゾイル基を表す。一般式(2)において、 $R^7$ は、好ましくは、水素原子、炭素数1~3のアルキル基を表し、更に好ましくは、水素原子、メチル基、を表す。一般式(2)において、 $R^8$ は、好ましくは、水素原子、炭素数1~3のアルキル基、または炭素数2~4のアルコキシカルボニル基を表し、更に好ましくは、水素原子、メチル基、メトキシカルボニル基、またはエトキシカルボニル基を表す。ここで $R^8$ がアルコキシカルボニル基を表す場合、 $R^7$ は好ましくは水素原子を表す。一般式(2)において、 $R^9$ は、好ましくは、水素原子、炭素数1~3のアルキル基、または炭素数2~4のアルコキシカルボニル基を表し、更に好ましくは、水素原子、メトキシカルボニル基、またはエトキシカルボニル基を表す。一般式(2)において、 $R^{10}$ は、好ましくは、メチル基もしくはエチル基を表し、 $R^{11}$ は、好ましくは水酸基、もしくはピリジル基で置換されていてもよいエチル基、もしくはプロピル基を表す。

【0012】式(1)で表される化合物は、その多くが公知であり、市販品として得ることができる。また、以下の方法で製造することもできる。

製造法：

【化9】



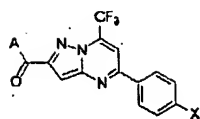
〔式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$  は前記と同義である。〕

式(1-2)のヒドラゾンは、公知化合物である式(1-1)の化合物とヒドラジン1水和物を、酸性条件下、 $0 \sim 100^\circ\text{C}$ で反応させることで製造できる。溶媒としては、メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒、クロロホルム、ジクロロメタンなどのハロゲン系溶媒、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルフォキシド、アセトン、アセトニトリル、ジオキサンやテトラヒドロフランなどのエーテル系溶媒、水またはこれらの混合溶媒等が用いられる。メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒がより好ましい。酸としては、酢酸、塩酸、硫酸、トリフルオロ酢酸などを用いることができる。この反応では、クロロホルム中、酸として硫酸を用いる等の方法により、式(1-2)の化合物を単離することなく、式(1-3)の化合物を製造することができる。式(1-2)の化合物を、メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒中、塩基を加えて加熱することにより、式(1-3)の化合物を得ることができる。塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、もしくは炭酸水素ナトリウムなどの無機塩基や、トリエチルアミン、もしくはピリジンなどの有機塩基が用いられる。好ましくは、炭酸カリウム、または炭酸ナトリウムを用いることができる。式(1-5)の化合物は、式(1-3)の化合物と式(1-4)で表される1,3-ジケトン、塩基もしくは酸の存在、または非存在下に、室温から $100^\circ\text{C}$ で反応させることにより製造できる。溶媒としては、メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒、クロロホルム、ジクロロメタンなどのハロゲン系溶媒、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルフォキシド、アセトン、アセトニトリル、ジオキサンやテトラヒドロフランなどのエーテル系溶媒、水またはこれらの混合溶媒等が用いられる。このうち、メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒がより好ましい。酸としては、酢酸、塩酸、または、塩化亜鉛などのルイス酸などを用いることができる。塩基として、ピロリジン、またはピペリジンなどの有機塩基を用いることができる。式(1-4)の化合物は、公知化合物を用いるか、あるいは本明細書実施例に記載された方法で製造することができる。また、式(1-5)の化合物は、式(1-2)の化合物から、式(1-3)の化合物を単離することなく製造することもできる。式(1-6)の化合物は、式(1-5)の化合物を加水分解してカルボン酸とした後、公知の方法に従い市販のアミン化合物と縮合させることにより製造できる。縮合方法としては、本明細書記載の水溶性カルボジイミド(WSCI)を用いる方法、混合酸無水物法、または、酸ハライドを用いる方法等が挙げられる。該縮合方法については「Comprehensive Organic Transformation (Larock, R.C., VCH Publishers, Inc. 1989)」等に記載されている。

【0013】一般式(1)で表される化合物の特に好ましいものとして、以下の式51～64の化合物が例示される。

【化10】





式	A	X	式	A	X
51		H	59		H
52		Cl	60		Cl
53		H	61		H
54		Cl	62		Cl
55		H	63		H
56		Cl	64		Cl
57		H			
58		Cl			

【0014】一般式(1)で表される化合物、またはその薬学上許容される塩は、PAR2の機能亢進が関与する疾患の治療剤、予防剤、または進行防止剤として有用である。該疾患として具体的には、関節炎(変形性関節炎、変形性関節症、脊椎関節症、痛風関節炎、全身性エリテマトーデス、若年性関節炎および慢性関節リウマチを含む)、熱(リウマチ熱並びにインフルエンザおよび他のウイルス性感染症関連熱)、一般的な感冒、月経困難、月経痙攣、炎症性腸疾患、クローン病、気腫、急性呼吸窮迫症候群、ぜん息、気管支炎、慢性閉塞性肺疾患、アレルギーハイマー病、器官移植毒性、悪液質、アレルギー反応、アレルギー性接触過敏症、癌(例えば、結腸癌、乳癌、肺癌および前立腺癌を含めた固形腫瘍癌;白血病およびリンパ腫を含めた造血悪性疾患;ホジキン病;再生不良性貧血、皮膚癌および家族性腺腫ポリポーシス)、組織潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、限局性腸炎、潰瘍性大腸炎、憩室炎、再発性胃腸病変、胃腸出血、凝固、貧血、滑膜炎、痛風、強直性脊椎炎、再狭窄、歯周病、表皮水泡症、骨粗しょう症、人工関節インプラントのゆるみ、アテローム硬化症(アテローム硬化症性血小板破壊)、大動脈瘤(腹部大動脈瘤および脳大動脈瘤)、結節性動脈周囲炎、うっ血性心不全、心筋梗塞、発作、大脳虚

血、頭部外傷、脊髄損傷、神経痛、神経変性疾患(急性および慢性)、自己免疫疾患、ハンティングトン病、パーキンソン病、片頭痛、うつ病、末梢神経障害、痛み(背の下部および首の痛み、頭痛並びに歯痛)、歯肉炎、大脳アミロイド血管障害、ヌートロピック(nootropic)または認識強化、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、目の脈管形成、角膜損傷、黄斑変性、結膜炎、異常創傷治療、筋肉もしくは関節の捻挫または緊張、腱炎、皮膚疾患(例えば、乾癬、湿疹、強皮症および皮膚炎)、重症筋無力症、多発性筋炎、筋炎、滑液包炎、熱傷、糖尿病(タイプIおよびII糖尿病、糖尿病性網膜症)、腫瘍浸潤、腫瘍成長、腫瘍転移、角膜傷跡、強膜炎、免疫不全疾患(例えば、人のエイズ、ネコのFLV、FIV)、敗血症、早産、低プロトロンビン血症、血友病、甲状腺炎、サルコイドーシス、ベーチェット症候群、過敏症、腎臓疾患等が挙げられる。好ましくは、関節炎(変形性関節症、脊椎関節症、痛風関節炎、全身性エリテマトーデス、若年性関節炎および慢性関節リウマチ等が挙げられる。)、皮膚炎、発熱、ぜん息、骨吸収、心臓血管疾患、月経困難、早産、腎炎、ネフローゼ、アテローム硬化症、低血圧、ショック、疼痛、疼痛を伴う神経組織由来の神経性炎症、癌、およびアルツハ

イマー病等の疾患が挙げられる。また、本発明者らは、実施例19からわかるように、関節を構成する軟骨や滑膜の培養細胞にPAR2が発現しているということ、および、実施例20からわかるように、軟骨や滑膜の細胞においてのPAR2を活性化させると関節炎増悪物質であるプロスタグランジンE2 (PGE2)の放出が起こるということを見出した。更に、本発明のPAR2阻害剤が、前記の軟骨や滑膜の細胞でのPGE2放出を、実際に抑制することを見出した。すなわち、PAR2阻害活性を有する化合物を有効成分とするPGE2産生抑制剤もまた本発明の態様の一つである。

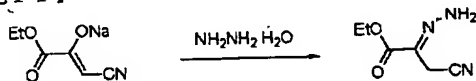
【0015】以下、本発明のPAR2阻害剤を有効成分として含有する、上記疾患の治療剤、予防剤、または進行防止剤等を医薬品として用いる場合の投与量および投与形態などにつき記述する。本発明のPAR2阻害剤は、経口または非経口投与、好ましくは経口投与することができ、薬剤としてそれぞれ経口または非経口投与に適した種々の剤型で、ヒトおよびヒト以外の動物に使用される。例えば、経口的に投与する場合、通常用いられる投与形態、例えば錠剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液などで投与することができる。非経口的に投与する場合、溶液、乳剤、懸濁液などの液剤を注射剤として投与すること、坐剤の型で直腸投与すること等ができる。このような投与剤型は、通常の担体、賦型剤、結合剤、安定化剤などの助剤と有効成分を配合することにより一般的方法に従って製造することができる。注射剤型で用いる場合は、緩衝剤、溶解補助剤、等張剤などを添加することもできる。投与量、投与回数は、対象とする疾患、患者の症状、年齢、体重等、および投与形態などによって異なるが、経口投与する場合、有効成分は通常は成人に対し1日あたり約1~1000mgの範囲、好ましくは、約10~500mgの範囲を1回または数回に分けて投与することができる。注射剤として投与する場合、有効成分は約0.1~約500mgの範囲、好ましくは約3~約100mgの範囲を1回または数回に分けて投与することができる。

【0016】

【実施例】実施例1

(2E)-3-シアノ-2-ヒドラゾノプロパン酸エチル

【化11】



エチルシアノピルベートナトリウムエノラート (ethyl cyanopyruvate sodium-enolate) (7.8g) を酢酸 (40ml) とエタノール (40ml) に溶かし、0℃でヒドラジン1

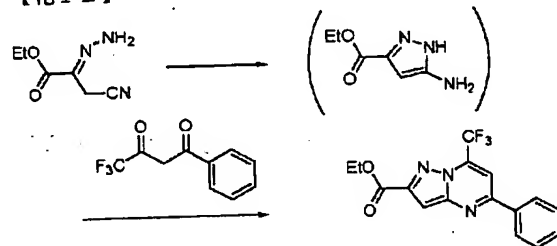
水和物を加えた。30分後室温にし、一晚攪拌した。反応液を濃縮後、水、クロロホルムを加え、分液、抽出した。有機層を乾燥、濃縮し、目的物 (5.0g) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm : 1.34-1.41(m, 3H), 3.46(s), 3.63(s), 4.26-4.38(m, 2H), 6.52(brs), 8.50(br)

【0017】実施例2

エチル 5-フェニル-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ [1,5-a]ピリミジン-2-カルボキシレート

【化12】



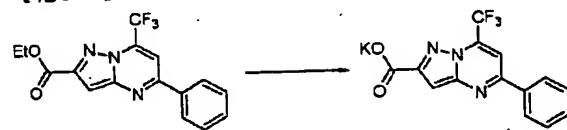
実施例1の化合物 (5.0g) をエタノール (50ml) に溶かし、炭酸カリウム (1.0g) を加え、加熱還流した。3時間後、4,4,4-トリフルオロ-1-フェニル-1,3-ブタンジオン (10.5g) を加え、加熱還流した。生じた結晶をろ過、乾燥し、目的物 (4.0g) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm : 1.37(t, 3H, J=7.1Hz), 4.42(q, 2H, J=7.1Hz), 7.44(s, 1H), 7.57-7.65(m, 3H), 8.31-8.38(m, 3H)

【0018】実施例3

5-フェニル-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ [1,5-a]ピリミジン-2-カルボン酸カリウム

【化13】



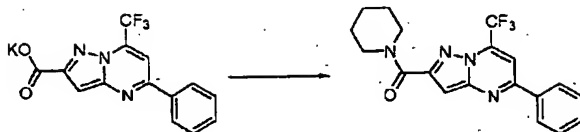
実施例2の化合物 (4.6g)、エタノール (50ml)、1N水酸化カリウム水溶液 (15ml) を混ぜ、加熱還流した。30分後、室温に冷却した。生じた結晶をろ過、乾燥し、目的物 (4.2g) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm : 6.87(s, 1H), 7.53-7.59(m, 3H), 8.02(s, 1H), 8.24-8.31(m, 2H)

【0019】実施例4

5-フェニル-2-(ピペリジン-1-イルカルボニル)-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ [1,5-a]ピリミジン

【化14】



実施例3で得た化合物 (3.0g) をDMFに溶かし、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (2.35g)、ピペリジン (0.95m l)、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (1.84g) を加え、室温で一晩攪拌した。反応液に、水、酢酸エチルを加え、分液、抽出した。有機層を、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮した。残渣をジイソプロピルエーテルで洗浄、ろ過、乾燥し、

目的物 (2.8g) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm : 1.62-1.78(m, 6H), 3.75-3.83(m, 4H), 7.17(s, 1H), 7.54-7.59(m, 3H), 7.68(s, 1H), 8.09-8.16(m, 2H)

【0020】実施例5

2-[(2-メチルピペリジン-1-イル)カルボニル]-5-フェニル-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

【化15】



実施例3で得た化合物と2-メチルピペリジンから、実施例4と同様の方法により目的物 (1.8g) を得た。

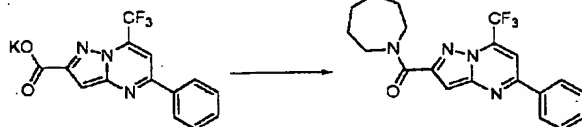
<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm : 1.30-1.40(m, 3H), 1.49-1.90(m, 6H), 2.90-3.30(m, 1H), 4.20-4.74(m, 1H), 4.55-5.14(m, 1H), 7.15(s, 1H), 7.54-7.59(m, 3H), 7.67(s, 1H), 8.09-8.15(m, 2H)

H), 7.67(s, 1H), 8.09-8.15(m, 2H)

【0021】実施例6

2-(アゼパン-1-イルカルボニル)-5-フェニル-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

【化16】



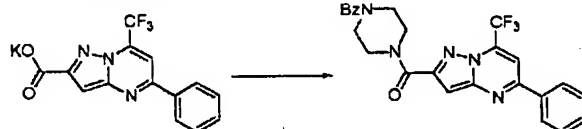
実施例3で得た化合物とヘキサメチレンイミンから、実施例4と同様の方法により目的物 (1.7g) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm : 1.60-1.73(m, 4H), 1.81-1.93(m, 4H), 3.73-3.85(m, 4H), 7.23(s, 1H), 7.54-7.59(m, 3H), 7.68(s, 1H), 8.09-8.15(m, 2H)

【0022】実施例7

2-[(4-ベンゾイルピペラジン-1-イル)カルボニル]-5-フェニル-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

【化17】



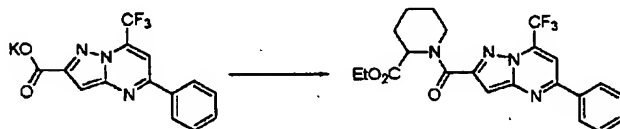
実施例3で得た化合物と1-ベンゾイルピペラジン塩酸塩から、実施例4と同様の方法により目的物 (1.6g) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm : 3.50-4.25(m, 8H), 7.28(s, 1H), 7.55-7.60(m, 3H), 7.72(brs, 1H), 8.10-8.15(m, 2H)

【0023】実施例8

エチル 1-[(5-フェニル-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-2-イル)カルボニル]ピペリジン-2-カルボキシレート

【化18】

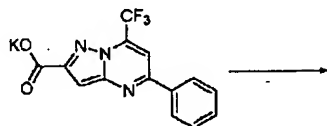


実施例3で得た化合物とピペコリン酸エチル塩酸塩か

ら、実施例4と同様の方法により目的物 (0.1g) を得

た。

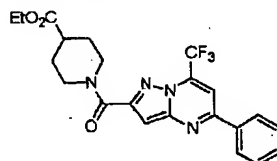
$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 1.26-1.35(m, 3H), 1.40-1.90(m, 5H), 2.28-2.43(m, 1H), 3.00-3.40(m, 1H), 4.20-4.32(m, 2H), 4.45-4.80(m, 1H), 5.45-5.60(m, 1H), 7.21-7.28(m, 1H), 7.53-7.60(m, 3H), 7.67-



7.71(m, 1H), 8.10-8.06(m, 2H)

## 【0024】実施例9

エチル 1-([5-フェニル-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-2-イル]カルボニル)ピペリジン-4-カルボキシレート



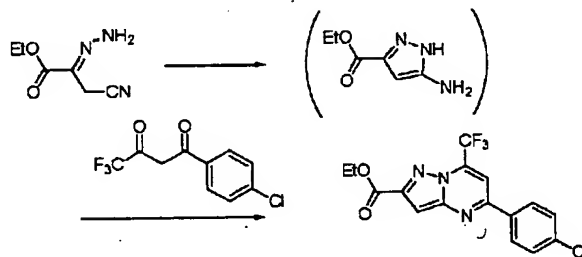
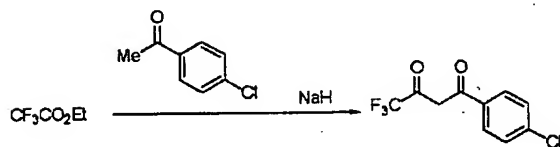
実施例3で得た化合物とイソニコチン酸エチルから、実施例4と同様の方法により目的物 (0.2 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 1.28(t, 3H,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 1.80-2.12(m, 4H), 2.64(m, 1H), 3.13(m, 1H), 3.37(m, 1H), 4.18(q, 1H,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 4.46-4.62(m, 2H), 7.21(s, 1H), 7.54-7.60(m, 3H), 7.69(s, 1H), 8.10-8.16(m, 2H)

## 実施例10

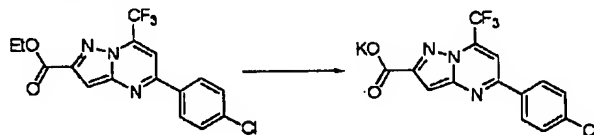
1-(4-クロロフェニル)-4,4,4-トリフルオロブタン-1,3-ジオン

## 【化19】



実施例1で得た化合物と実施例10で得た化合物を用いて、実施例2と同様の方法で目的物 (4.3 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 1.47(t, 3H,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 4.51(q, 2H,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 7.38(s, 1H), 7.52-7.57(m, 2H), 7.71(s, 1H), 8.07-8.12(m, 2H)



実施例11で得た化合物から、実施例3と同様の方法で目的物 (3.5 g) を得た。

## 【0027】実施例13

5-(4-クロロフェニル)-2-(ピペリジン-1-イルカルボニル)-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

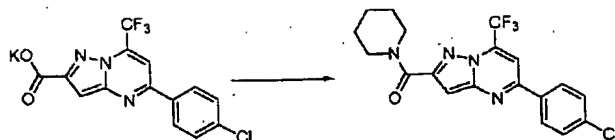
## 【0026】実施例12

5-(4-クロロフェニル)-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-2-カルボン酸カリウム

## 【化21】

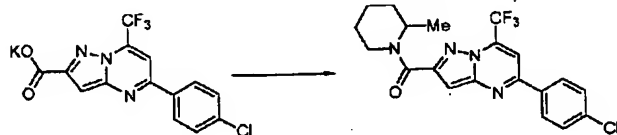
5-(4-クロロフェニル)-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

## 【化22】



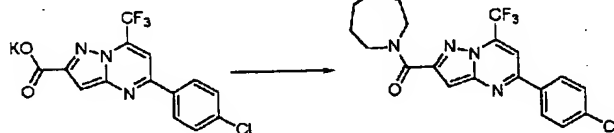
実施例12で得た化合物とピペリジンから、実施例4と同様の方法により目的物 (0.1 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 1.61-1.77(m, 6H), 3.76-3.83(m, 2H), 7.18(s, 1H), 7.51-7.56(m, 2H), 7.63(s, 1H), 8.06-8.11(m, 2H)



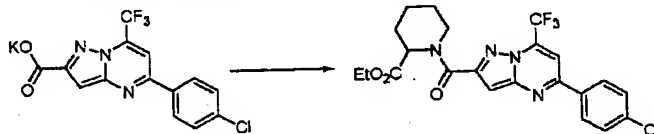
実施例12で得た化合物と2-メチルピペリジンから、実施例4と同様の方法により目的物 (0.1 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 1.31-1.40(m, 3H), 1.50-1.90(m, 6H), 2.90-3.30(m, 1H), 4.20-4.73(m, 1H), 4.53-5.15(m, 1H), 7.14(s, 1H), 7.51-7.56(m, 2H), 7.63(s, 1H), 8.06-8.11(m, 2H)



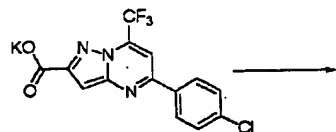
実施例12で得た化合物とヘキサメチレンイミンから、実施例4と同様の方法により目的物 (0.1 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 1.60-1.71(m, 4H), 1.80-1.92(m, 4H), 3.73-3.84(m, 4H), 7.23(s, 1H), 7.51-7.56(m, 2H), 7.63(s, 1H), 8.06-8.11(m, 2H)



実施例12で得た化合物とピペコリン酸エチル塩酸塩から、実施例4と同様の方法により目的物 (1.6 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 1.26-1.35(m, 3H), 1.36-1.90(m, 5H), 2.27-2.42(m, 1H), 3.00-3.40(m, 1H), 4.20-4.33(m, 2H), 4.50-4.80(m, 1H), 5.50-5.58(m, 1H), 7.22-7.26(m, 1H), 7.50-7.56(m, 2H), 7.62-7.66(m, 1H), 8.06-8.12(m, 2H)

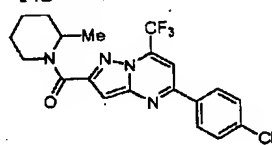


実施例12で得た化合物と2-(メチルアミノ)エタノールから、実施例4と同様の方法により目的物 (1.8 g) を得た。

#### 【0028】実施例14

5-(4-クロロフェニル)-2-[(2-メチルピペリジン-1-イル)カルボニル]-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

#### 【化23】

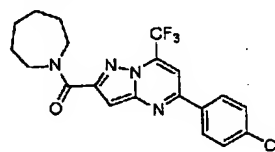


H), 7.63(s, 1H), 8.06-8.11(m, 2H)

#### 【0029】実施例15

2-(アゼパン-1-イルカルボニル)-5-(4-クロロフェニル)-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

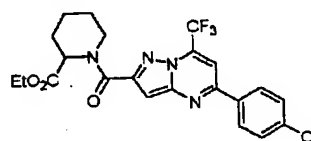
#### 【化24】



#### 【0030】実施例16

エチル 1-([5-(4-クロロフェニル)-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-2-イル]カルボニル)ピペリジン-2-カルボキシレート

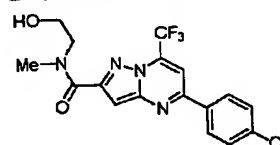
#### 【化25】



(m, 1H), 7.22-7.26(m, 1H), 7.50-7.56(m, 2H), 7.62-7.66(m, 1H), 8.06-8.12(m, 2H)

#### 実施例17

5-(4-クロロフェニル)-N-(2-ヒドロキシアミド)-N-メチル-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-2-カルボキシアミド



$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 3.05-3.24(m, 1H), 3.24-3.47(m, 3H), 3.78-4.00(m, 4H), 7.27-7.33(m, 1H), 7.51-7.58(m, 2H), 7.65-7.70(m, 1H), 8.06-8.12(m, 2H)

(m, 2H)

【0031】実施例18: Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR) を用いた細胞内カルシウム濃度測定 (材料と方法) 牛胎児血清10% (10%FBS) 添加DMEM培養液 (インビトロジェン社) を用いて培養したヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293細胞を  $2.5 \times 10^5$  cells/ml に調製し、ポリDリジンでコートした96穴黒色プレート (透明底) (ファルコン社) に  $80 \mu\text{l/well}$  播いて、炭酸ガス培養装置で一晩培養した。Hanks-20mM Hepes 緩衝液 (pH7.4) で調製したFLIPR Calcium Assay Kit (Molecular Devices社) を細胞に  $80 \mu\text{l/well}$  添加して、1時間炭酸ガス培養装置にて培養した。Hanks-20mM Hepes緩衝液 (pH7.4) で、0.0005% に調製したtrypsin (SIGMA社 T8642)

を、96穴V底ポリプロピレンプレート (ヌンク社) に添加して試薬プレートとした。FLIPR (Molecular Devices社) で測定する直前に、Hanks-20mM Hepes緩衝液 (pH7.4) で調製した被検化合物を、細胞に  $40 \mu\text{l/well}$  添加し、プレートシェーカーで攪拌した。被検化合物を添加した細胞プレートと試薬プレートをFLIPRにセットし、細胞内カルシウム濃度の変化をCCDカメラにて検出した。測定は室温で70秒間行い、試薬プレートから細胞プレートへの試薬の添加 ( $50 \mu\text{l/well}$ ) は、FLIPR本体内蔵の96well自動分注機で行った。

【結果】被検化合物の細胞内カルシウム上昇抑制率 (%) を、表1に示した。

【表1】

化合物	化合物濃度	抑制率 (%)
実施例 4の化合物	$10 \mu\text{g/ml}$	90.5
実施例 5の化合物	$10 \mu\text{g/ml}$	52.1
実施例 6の化合物	$10 \mu\text{g/ml}$	52.8
実施例 7の化合物	$10 \mu\text{g/ml}$	51.4
実施例 8の化合物	$10 \mu\text{g/ml}$	79.6
実施例 13の化合物	$10 \mu\text{g/ml}$	63.7
実施例 14の化合物	$10 \mu\text{g/ml}$	47.6
実施例 15の化合物	$10 \mu\text{g/ml}$	67.5
実施例 17の化合物	$10 \mu\text{g/ml}$	40.5

【0032】実施例19: PAR2抗体を用いたウェスタンブロッティング

ヒト滑膜様細胞株SW982、ヒト軟骨様細胞株SW1353、ヒト肺ガン由来細胞株A549、ヒト胎児肺由来細胞株HFL1、ヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293を  $2.5 \times 10^5$  細胞/ml になるようにFBS10%を含むDMEM培養液 (インビトロジェン社)、あるいはFBS10%を含むF12K培養液 (インビトロジェン社) で懸濁し、12穴プレート (旭テクノグラス社) に  $1 \text{ml/well}$  になるように各細胞を播きこんだ。炭酸ガス培養装置内で二晩培養した後、RIPA buffer (1xPBS, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM PMSF,  $1 \mu\text{g/ml}$  トリプシン阻害剤,  $1 \mu\text{g/ml}$  ロイペプチン)  $30 \mu\text{l/well}$  を加えて、細胞の溶解、懸濁を行った。溶解液  $25 \mu\text{l}$  に2X Sample buffer  $25 \mu\text{l}$  を加えて、 $100^\circ\text{C}$  5分間の熱処理を行った後、 $10 \mu\text{l}$  を分取して10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。泳動後ブロッティング槽 (Bio-Rad) を用いて、50V 2時間の条件でサンプルをImmobilon-PVDFメンブレン (ミリポア) に転写した。メンブレンは3%スキムミルク-0.1%Tween-PBS溶液で4℃一晩のブロッキングを行った後、500倍に希釈したヒトPAR2抗体 (Santa Cruz #sc-8205(C-17)) を用いて室温で3時間反応させた。反応後メンブレンの洗浄を行い、5000倍に希釈した2次抗体 (アマシャムファルマシア社) を用いて室温で1時間反応させた。その後、ECLウェスタンブロッティング検出システムプロトコール (ア

マシャムファルマシア社) に従って、シグナルの検出を行った。結果を図1に示した。図1より、ヒト滑膜様細胞株SW982、ヒト軟骨様細胞株SW1353においても、現在までに発現が報告されているA549、HFL1、HEK293等の細胞株と同様にPAR2が発現していることが明らかとなった。

【0033】実施例20: ヒト滑膜様細胞株SW982を用いたPGE2量の測定  
SW982細胞を  $2.5 \times 10^5$  細胞/ml になるように各培地で希釈し、96穴プレートに  $100 \mu\text{l/well}$  の細胞を播きこんだ。炭酸ガス培養装置内で一晩前培養した後、培地を除去し、 $5 \mu\text{g/ml}$  化合物入り培地を  $80 \mu\text{l/well}$  添加した (コントロール群、コントロールペプチド群、アゴニストペプチド単独群、IL-1 $\beta$ 群には0.1%DMSO含有培地を添加した)。化合物を入れたウェルには  $500 \mu\text{M}$  アゴニストペプチド入り培地を  $20 \mu\text{l/well}$  添加した (終濃度は  $4 \mu\text{g/ml}$  化合物・ $100 \mu\text{M}$  アゴニストペプチド)。コントロール群のウェルには各培地を  $20 \mu\text{l/well}$ 、コントロールペプチド群のウェルには  $500 \mu\text{M}$  コントロールペプチド入り培地を  $20 \mu\text{l/well}$  (終濃度  $100 \mu\text{M}$ )、アゴニストペプチド単独群のウェルには  $500 \mu\text{M}$  アゴニストペプチド入り培地を  $20 \mu\text{l/well}$  (終濃度  $100 \mu\text{M}$ )、IL-1 $\beta$ 群のウェルには  $50 \text{ng/ml}$  IL-1 $\beta$ 入り培地を  $20 \mu\text{l/well}$  (終濃度  $10 \text{ng/ml}$ ) の割合で添加した。24時間後 (N=3) に各上清を回収し-80℃で測定時まで保管した。各

上清中のPGE<sub>2</sub>量の測定は、プロスタグランジンE<sub>2</sub> EIA (Cayman chemical 514010) を用いて行った。コントロールペプチドのPGE<sub>2</sub>量の値を 阻害率100%、アゴニストペプチドのPGE<sub>2</sub>量を阻害率0% として、各化合物のPGE<sub>2</sub>

産生阻害率を計算した。ヒト滑膜様細胞株SW982の各刺激によるPGE<sub>2</sub>産生量 (pg/ml) を表2に示した。

【表2】

刺激剤	PGE <sub>2</sub> 産生量 (pg/ml)
—	900
SLIGRL (アゴニストペプチド)	2000
LSIGRL (コントロールペプチド)	900

また、被験化合物のPGE<sub>2</sub>産生阻害率 (%) を表3に示した。

【表3】

	0.25 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml
実施例 4の化合物	84	119
実施例 6の化合物	58	115
実施例 17の化合物	71	111
実施例 13の化合物	97	75
実施例 8の化合物	21	135
実施例 14の化合物	56	192
実施例 15の化合物	91	119
実施例 9の化合物	55	91
実施例 16の化合物	98	131

表2および表3の結果から、滑膜細胞のPAR2が活性化されると炎症・疼痛増悪因子であるPGE<sub>2</sub>の放出がおこること、また本発明により見出されたPAR2阻害剤は、これらのPAR2の活性化に伴って起こるPGE<sub>2</sub>の産生を阻害可能であることがわかる。

【0034】

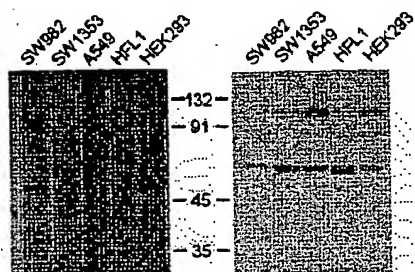
【発明の効果】本発明により、PAR2が関与する疾患の治療剤、予防剤、または進行防止剤として有用なPAR2阻害剤を提供することが可能になった。

【0035】

【図面の簡単な説明】

【図1】 (左)各細胞懸濁液の SDS-PAGE染色像を表す。各サンプル 0.6cm<sup>2</sup>で生育する細胞に相当する量を泳動した。(右) 抗ヒト PAR2 抗体を使用した ウェスタンブロッティングの結果を表す。PAR2 は 糖鎖付加を受けるので複数のバンドが検出される。すべての細胞でPAR2が発現していることがわかる。SW982:ヒト滑膜様細胞株; SW1353:ヒト軟骨様細胞株; A549:ヒト肺ガン由来細胞株; HFL1:ヒト胎児肺由来細胞株; HEK293:ヒト胎児腎臓由来細胞株。

【図1】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

ターム(参考)

A 6 1 P 9/10

1 0 3

A 6 1 P 9/10

1 0 3

11/00

11/00

19/00

19/00

21/04

21/04

25/00

25/00

25/16

25/16

25/28

25/28

29/00

29/00

1 0 1

1 0 1

31/04

31/04

31/18

31/18

35/00

35/00

37/08

37/08

43/00

43/00

1 1 1

1 1 1

C 0 7 D 487/04

1 4 2

C 0 7 D 487/04

1 4 2

(72)発明者 小川 慎志

愛知県知多郡武豊町祠峯1-46 ロイヤル

パレスハウゼン 5C室

Fターム(参考) 4C050 AA01 BB05 CC08 EE03 FF05

GG01 HH01 HH04

4C086 AA01 AA02 CB06 MA01 MA04

NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA36

ZA40 ZA45 ZA59 ZA68 ZA94

ZA96 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26

ZB35 ZC20 ZC35 ZC55